

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian *Post Test only with Control Group Design*, dilakukan pengamatan terhadap jumlah sel trombosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang. Penelitian ini dilakukan selama 18 hari.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar.

4.3.2 Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar dengan berat 150-200 gram dan berusia 2-3 bulan dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan aktif, bulu tebal putih, dan mata jernih.

4.3.3 Replikasi penelitian

Menurut (Wan dan Wan, 2017) besar sampel ditentukan dengan rumus *Minimum and Maximum Sample Size for Three ANOVA Designs*, yaitu $DF = N - k = kn - k = k(n - 1)$, dengan $DF = \text{Degrees of Freedom}$ (derajat kebebasan), $N =$ total subjek, $k =$ jumlah kelompok, dan $n =$ jumlah subjek per kelompok. Dengan mengatur ulang rumus, n diberikan sebagai $n = DF / k + 1$.

Berdasarkan rentang DF yang dapat diterima, DF dalam formula diganti dengan minimal (10) dan maksimal (20) untuk diperoleh jumlah hewan minimal dan maksimal per grup :

$$\text{Minimal } n = 10 / k + 1$$

$$\text{Maksimal } n = 20 / k + 1$$

Secara total, jumlah minimal dan maksimal yang dibutuhkan adalah :

$$\text{Minimal } N = \text{minimal } n \times k$$

$$\text{Maksimal } N = \text{maksimal } n \times k$$

Maka hasil besar sampel pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$\text{Minimal } n = 10 / 5 + 1$$

$$n = 2 + 1$$

$$n = 3 \text{ hewan}$$

$$\text{Maksimal } n = 20 / 5 + 1$$

$$n = 4 + 1$$

$$n = 5 \text{ hewan}$$

Jumlah minimal dan maksimal yang dibutuhkan adalah :

$$\text{Minimal } N = 3 \times 5$$

$$N = 15 \text{ hewan}$$

$$\text{Maksimal } N = 5 \times 5$$

$$N = 25 \text{ hewan}$$

Maka didapatkan hasil minimal jumlah sampel yaitu 15 hewan dan maksimal 25 hewan.

Berdasarkan hasil perhitungan rumus diatas, jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok, sehingga tiap kelompok perlakuan terdiri atas 5 ekor tikus.

4.3.4 Teknik pengambilan sampel

Pengambilan sampel yang dilakukan peneliti menggunakan teknik *simple random sampling* yaitu pengambilan sampel dengan cara acak sederhana.

4.3.5 Karakteristik sampel penelitian

4.3.5.1 Kriteria inklusi

1. Tikus putih (*Rattus norvegicus*)
2. Jenis kelamin jantan
3. Umur tikus 2-3 bulan
4. Berat tikus 150-200 gram
5. Tikus sehat: gerakan aktif, bulu tebal putih, mata jernih

4.3.5.2 Kriteria eksklusi

1. Tikus yang sakit sebelum perlakuan
2. Tikus yang mati sebelum perlakuan
3. Tikus yang sudah pernah dipakai dalam penelitian

4.3.5.3 Kriteria *drop out*

1. Tikus yang sakit setelah perlakuan
2. Tikus yang mati setelah perlakuan

4.3.6 Variabel penelitian

4.3.6.1 Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini ialah dosis ekstrak kurma (*Phoenix dactylifera*) varietas Ajwa.

4.3.6.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah jumlah sel trombosit tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar.

4.3.7 Definisi operasional

Tabel 4.1 Definisi Operasional Penelitian

No	Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukur / Indikator	Cara Ukur	Alat	Skala data
1.	Ekstrak buah kurma (<i>Phoenix dactylifera</i>) varietas Ajwa.	Buah Kurma (<i>Phoenix dactylifera</i>) yang digunakan adalah dari varietas Ajwa dan diperoleh di toko Bursa Sajadah, Pasar Besar, kota Malang.	Dosis I : 25 mg/kgBB/ hari selama 2 hari Dosis II : 50 mg/kgBB/ hari selama 2 hari Dosis III : 100 mg/kgBB/ hari selama 2 hari	Diberikan peroral menggunakan sonde setiap hari selama 2 hari.	Timbangan (Miligram Balance)	Kategorik (Ordinal)
2.	Jumlah trombosit sel	Jumlah sel trombosit akan diukur dengan menggunakan alat <i>Automated Hematology Analyzer</i> .	Data disajikan dalam bentuk tabel hasil penelitian.	Hewan coba diambil darahnya yang berasal dari ventrikel kiri dengan cara melakukan pembedahan dibagian ventral terlebih dahulu.	<i>Automated Hematology Analyzer</i>	Numerik (Ratio)
3	Kotrimoksazol	Bahan penginduksi tikus yang menyebabkan penurunan jumlah sel trombosit (trombositopenia).	Dosis yang digunakan ialah 172,8 mg/kgBB/ hari.	Diberikan peroral menggunakan sonde selama 8 hari.	Timbangan (Miligram Balance)	Numerik

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

4.4.1.1 Alat pemeliharaan tikus

- a. Kandang pemeliharaan tikus
- b. Botol minum tikus
- c. Kawat kasa untuk penutup kandang

4.4.1.2 Alat pembuatan ekstrak buah kurma

- a. Sarung tangan (*handscoon*)
- b. Oven elektrik
- c. *Blender*
- d. *Beaker glass*
- e. *Rotary evaporator*

4.4.1.3 Alat pemberian ekstrak buah kurma

- a. Sarung tangan (*handscoon*)
- b. Sonde oral 5 ml
- c. Beaker glass

4.4.1.4 Alat penginduksi kotrimoksazol

- a. Sarung tangan (*handscoon*)
- b. Sonde oral 5 ml
- c. *Beaker glass*

4.4.1.5 Alat pengambilan darah tikus

- a. Silet/pisau
- b. Spuit 5 cc

- c. Jarum ukuran 23 *gauge*
- d. Tabung *eppendorf* berisi *EDTA*

4.4.1.6 Alat Penghitungan jumlah sel trombosit tikus

- a. *Automatic Hematology Analyzer*

4.4.2 Bahan

4.4.2.1 Bahan pemeliharaan tikus

- a. Pakan standar BR-1
- b. Aquades

4.4.2.2 Bahan pembuatan ekstrak buah kurma

- a. Buah kurma (*Phoenix dactylifera*) varietas *Ajwa*
- b. Ethanol

4.4.2.3 Bahan pembuatan penginduksi (kotrimoksazol)

- a. Kotrimoksazol
- b. Aquades

4.4.2.4 Bahan pengambilan darah tikus

- a. Anastesi xylazine+ketamine

4.5 Dasar Penentuan Dosis

4.5.1 Dosis kotrimoksazol

Dalam penelitian (Jatmiko, et al., 2016) pemberian kotrimoksazol 172,8 mg/kgBB secara oral selama 8 hari menyebabkan trombositopenia pada tikus. Sehingga dalam penelitian ini, dosis kotrimoksazol yang digunakan sebagai bahan penginduksi adalah sebesar 172,8 mg/kgBB secara oral selama 8 hari.

4.5.2 Dosis ekstrak buah kurma

Dasar penghitungan dosis ekstrak buah kurma (*Phoenix dactylifera*) varietas *Ajwa* adalah penelitian terdahulu tentang ekstrak etanol buah kurma berpengaruh pada jumlah sel trombosit pada tikus putih yang diinduksi heparin pada dosis efektif 10 mg/200 gBB/hari. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, peneliti ingin mengetahui pengaruh pemberian dosis ekstrak buah kurma pada dosis yang lebih kecil maupun yang lebih besar dari dosis efektif yaitu 10 mg/200 gBB/hari atau 50 mg/kgBB/hari (Roihatul, et al., 2016). Sehingga untuk menentukan variasi dosis pada penelitian ini akan menggunakan rumus variasi dosis $1/2n$, n , dan $2n$.

Dosis ekstrak buah kurma (*Phoenix dactylifera*) varietas *Ajwa* pada penelitian ini yaitu:

Dosis 1 : 25 mg/kgBB/hari

Dosis 2 : 50 mg/kgBB/hari

Dosis 3 : 100mg/kgBB/hari

Tiap dosis akan dibagi dengan massa jenis ekstrak. Penentuan massa jenis ekstrak dilakukan dengan alat piknometer, yang akan dimasukkan ke dalam rumus :

$$\text{Massa Jenis } (\rho) = \frac{\text{Massa Ekstrak}}{\text{Volume Ekstrak}}$$

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Proses adaptasi

Proses adaptasi hewan coba dalam kandang pada hari ke-1 sampai hari ke-7 dengan tujuan agar tikus menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru. Selama adaptasi tikus diberikan pakan standar BR-1 dan aquades.

4.6.2 Pembagian kelompok dan perlakuan tikus

Setelah diadaptasikan selama 1 minggu, 25 ekor tikur putih jantan (*Rattus novergicus strain Wistar*) dibagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus yang masing-masing kelompok ditempatkan pada kandang yang terpisah. Kemudian dilakukan perlakuan sebagai berikut:

- a. Kontrol negatif: Diberi pakan standar BR-1 serta minum aquades *ad libitum* selama penelitian berlangsung.
- b. Kontrol positif: Dinduksi kotrimoksazol 172,8 mg/kgBB/hari dan CMC Na 0,5% selama 8 hari dengan sonde oral, pakan standar BR-1 serta minum aquades *ad libitum*.
- c. Perlakuan 1: Dinduksi kotrimoksazol 172,8 mg/kgBB/hari dan CMC Na 0,5% selama 8 hari dengan sonde oral. Setelah itu, diberi pakan standar BR-1 serta minum aquades *ad libitum* dan ekstrak buah kurma 25 mg/kgBB/hari selama 2 hari.
- d. Perlakuan 2: Dinduksi kotrimoksazol 172,8 mg/kgBB/hari dan CMC Na 0,5% selama 8 hari dengan sonde oral. Setelah itu, diberi pakan standar BR-1 serta minum aquades *ad libitum* dan ekstrak buah kurma 50 mg/kgBB/hari selama 2 hari.
- e. Perlakuan 3: Dinduksi kotrimoksazol 172,8 mg/kgBB/hari dan CMC Na 0,5% selama 8 hari dengan sonde oral. Setelah itu, diberi pakan standar BR-1 serta minum aquades *ad libitum* dan ekstrak buah kurma 100 mg/kgBB/hari selama 2 hari.

Pada hari ke-18, semua tikus dianastesi, kemudian dibedah dibagian ventral untuk diambil darahnya guna menghitung jumlah sel trombositnya menggunakan *Automatic Hematology Analyzer* (Roihatul, et al., 2016).

4.6.3 Pembuatan ekstrak buah kurma

Pembuatan ekstrak dilakukan di Materia Medika, Batu. Persiapan dilakukan dengan mengambil kurma varietas *Ajwa* yang masih segar (tanpa biji). Kemudian, kurma dipotong kecil-kecil untuk diletakkan ke dalam toples dan direndam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3 liter dan kemudian diaduk sampai halus dan kemudian toples ditutup selama 4-5 hari (maserasi). Saring ekstrak buah kurma dengan corong bucher dengan menggunakan pompa isap. Hasil ekstrak yang diperoleh kemudian dikeringkan untuk dimasukkan ke dalam evaporator vakum laburotari dan dipadatkan (suhu 40 °C) selama 1 jam (Zahroh R, 2016).

4.6.4 Pemberian bahan penginduksi (kotrimoksazol)

Tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan strain wistar diberikan obat kotrimoksazol dengan dosis sebesar 172,8 mg/kgBB per oral, satu kali sehari selama 8 hari (Jatmiko, et al., 2016). Serta ditambahkan CMC Na 0,5% 25 ml/kgBB/hari sebagai bahan pengental agar bahan penginduksi tidak mengendap dalam tubuh tikus (Hooton JC, 2009).

4.6.5 Pengambilan darah tikus

Tikus yang akan dibedah dianastesi terlebih dahulu menggunakan xylazine+ketamine dengan dosis 16mg + 60mg secara intraperitoneal (i.p). Setelah tikus terlihat tidak aktif, segera dilakukan pembedahan. Pembedahan

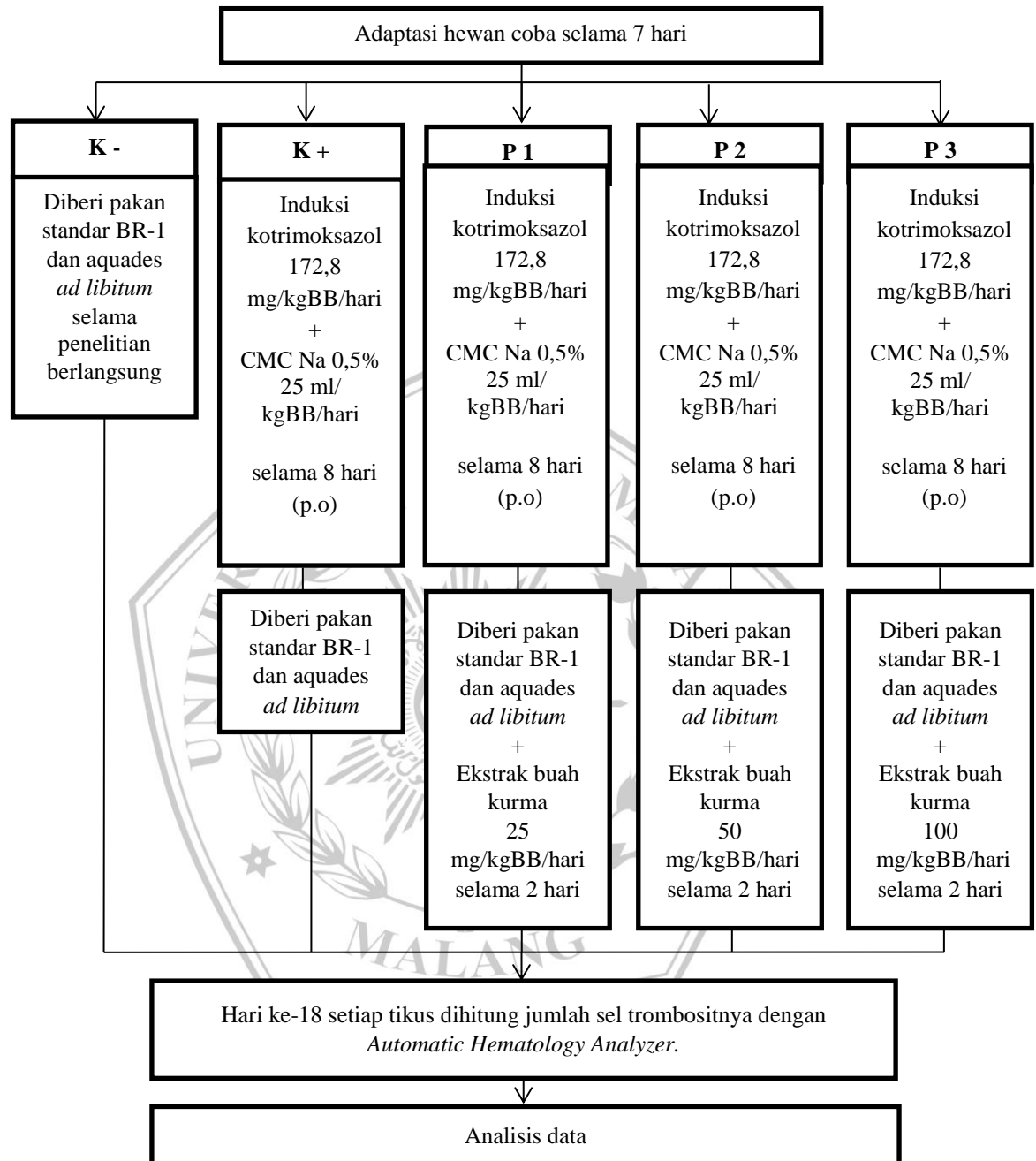
dilakukan pada bagian ventral, sampel darah diambil sebanyak 3-5ml dari ventrikel kiri menggunakan jarum berukuran 23 *gauge* dengan menggunakan spuit ukuran 5ml secara perlahan-lahan agar tidak terjadi kolaps. Setelah pengambilan sampel darah selesai, tikus harus segera dimatikan. Sampel darah yang sudah diambil ditampung dalam tabung *eppendorf* yang mengandung anti koagulan EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) (Manoj, et al., 2017).

4.6.6 Penghitungan jumlah sel trombosit tikus

Jumlah sel trombosit tikus dihitung menggunakan *Automatic Hematology Analyzer* (Manoj, et al., 2017).



4.7 Kerangka Operasional Penelitian



4.8 Analisis Data

Data-data dalam penelitian ini dianalisis dengan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Kemudian, jika distribusi data normal dan homogen, data dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA*.

a. Uji Normalitas

Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui sebaran data normal atau tidak dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Sebaran data dikatakan normal apabila $\text{sig} > 0,05$. Apabila sebaran data tidak normal, maka dilakukan transformasi data terlebih dahulu. Apabila hasil transformasi data normal, dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Apabila sebaran data tetap tidak normal, maka menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Post-Hoc Mann-Whitney*.

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui varian atau kehomogenan data yang diperoleh dengan menggunakan uji *Levene Test*. Data dikatakan homogen apabila $\text{sig} > 0,05$. Apabila data homogen, dilanjutkan uji *Post Hoc Bonferroni*, apabila data tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Tam Haney*.

c. Uji *One Way ANOVA*

Apabila sebaran data normal, maka dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk membuktikan adanya perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Apabila diperoleh sebaran data tidak normal, maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis*.

Proses perhitungan dilakukan dengan bantuan perangkat lunak komputer program SPSS 24 *for windows*.